



Máster Universitario en Neurociencia

ANGIOTENSINA 1-7/RECEPTOR MAS EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Débora Pita Illobre
Universidad de A Coruña

Julio 2016/2017



ANGIOTENSINA 1-7/RECEPTOR MAS EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER PRESENTADO POR:

Débora Pita Illobre

TUTORES:

José Luis Labandeira García

Catedrático de Anatomía y Embriología Humana

Rita Valenzuela Limiñana

Investigadora postdoctoral

Dpto Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Universidad de Santiago de Compostela

D. JOSE LUIS LABANDEIRA GARCÍA, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana,
y D^a. RITA VALENZUELA LIMIÑANA, investigadora postdoctoral del Departamento de
Ciencias Morfológicas de la facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de
Compostela

HACEN CONSTAR QUE:

D^a. DÉBORA PITA ILLOBRE ha realizado, bajo nuestra tutela, su trabajo fin de máster
titulado: Angiotensina 1-7/Receptor Mas en neuronas dopaminérgicas, y que dicho trabajo
reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado y valorado por la comisión
correspondiente.

En Santiago de Compostela, 14 de Julio 2017



Fdo: José Luis Labandeira García
Catedrático de Anatomía y Embriología
Dpto Ciencias Morfológicas



Fdo: Rita Valenzuela Limiñana
Investigadora Postdoctoral
Dpto Ciencias Morfológicas



Fdo: Débora Pita Illobre
Alumna del máster en neurociencia

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	1
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOPATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
1.1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	5
1.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	7
1.2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CLÁSICO	7
1.2.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA LOCAL	9
1.2.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRACELULAR	10
1.2.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	10
1.3. ANGIOTENSINA 1-7 Y RECEPTOR MAS	12
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. CULTIVOS CELULARES	15
3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT	15
3.2.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	15
3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	16
3.2.3. WESTERN BLOT	16
3.3. INMUNOCITOQUÍMICA	17
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
4. RESULTADOS	19
4.1. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA N27 A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	19
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN N27	22
4.3. PRESENCIA DEL RECEPTOR MAS EN LAS N27 DIFERENCIADAS	23
4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	24
5. DISCUSIÓN	26
5.1. PUESTA A PUNTO DE LA LÍNEA CELULAR N27	26
5.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA LÍNEA DOPAMINÉRGICA N27. PRESENCIA DEL RECEPTOR MAS	27
6. CONCLUSIONES	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30

ABREVIATURAS

- A(1-7)**: Angiotensina (1-7)
- A(1-9)**: Angiotensina (1-9)
- AGT**: Angiotensinógeno
- AI**: Angiotensina I
- AII**: Angiotensina II
- AT1**: Receptor de angiotensina II de tipo 1
- AT2**: Receptor de angiotensina II de tipo 2
- BSA**: Proteína sérica bovina
- DAT**: Transportador de dopamina
- DHEA**: Dihidroepiandrosterona
- ECA2**: Enzima convertidora de angiotensina 2
- ECA**: Enzima convertidora de angiotensina
- EO**: Estrés oxidativo
- EP**: Enfermedad de Parkinson
- GADPH**: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- Gpe**: Globo pálido externo
- Gpi**: Globo pálido interno
- HRP**: Peroxidasa de rábano
- JG**: Células yuxtglomerulares
- LRRK2 (PARK 8)**: Quinasa 2 rica en repeticiones de leucina
- NO**: Óxido nítrico
- NST**: Núcleo subtalámico
- PAP**: Peroxidasa-antiperoxidasa
- PARK 3**: Sepiapterina reductasa
- PARK 7**: DJ-1
- PET**: Tomografía por emisión de positrones
- PINK1 (PARK 6)**: Quinasa 1 p-ten inducida
- PRKN (PARK 2)**: Ubiquitina E3 ligasa
- PRR**: Receptor de prorenina
- RMas**: Receptor Mas
- ROS**: Especies reactivas de oxígeno
- SNCA (PARK 1)**: α -sinucleína

- SNpc:** Sustancia nigra *pars* compacta
- SNr:** Sustancia nigra *pars* reticulada
- SPECT:** Tomografía por emisión monofotónica
- SPR:** Sepiapterina reductasa
- SRA:** Sistema renina-angiotensina
- ST:** Estradio
- TH:** Tirosina hidroxilasa
- UCHL1 (PARK 5):** Ubiquitina carboxil-hidroxilasa 1
- WB:** Western Blot

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez como un síndrome neurológico por James Parkinson en 1817 en su libro “An essay on the shaking palsy”. Algunos aspectos clínicos ya se habían descrito en años anteriores, pero la enfermedad era conocida como “parálisis temblorosa”, hasta que 50 años más tarde, Jean-Martin Charcot se refirió a ella como la *enfermedad de Parkinson*.

La EP es una enfermedad neurodegenerativa que aparece como consecuencia de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo, así como la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy que están formados por agregados insolubles de la proteína α -sinucleína anormalmente plegada. Como resultado de la deficiencia de dopamina dentro de los ganglios basales, se produce un desorden del movimiento caracterizado por síntomas motores clásicos parkinsonianos (De Virgilio y col., 2016; Martínez-Fernández y col., 2016).

Los ganglios basales son núcleos subcorticales que incluyen el núcleo estriado (ST), que está formado por el núcleo caudado y putamen, el núcleo subtalámico (NST) y el globo pálido externo (Gpe) e interno (Gpi). Estos núcleos a su vez establecen conexiones con la SNpc, la sustancia nigra *pars reticulada* (SNr) y el núcleo ventro-lateral del tálamo. Además, están interconectados anatómicamente y funcionalmente, y, mediante proyecciones al tálamo y tronco cerebral constituyen la red córtico-subcortical (Martínez-Fernández y col., 2016) (Figura 1).

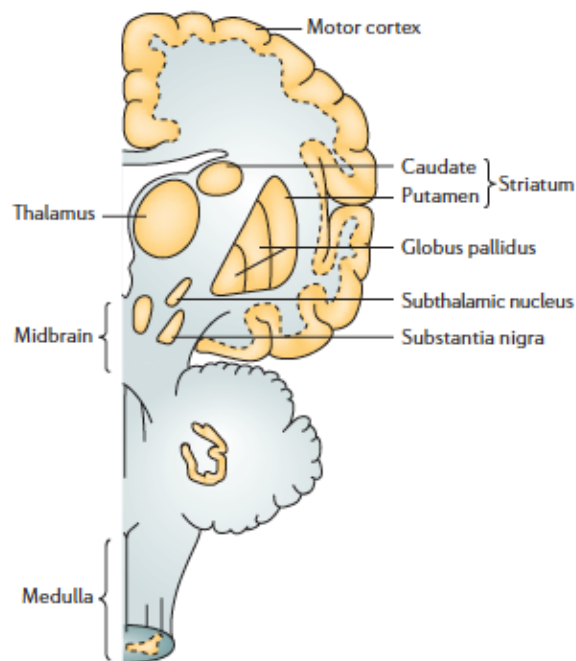


Figura 1. Sección lateral de un cerebro humano en el que se muestran las principales regiones afectadas en la enfermedad de Parkinson (Farrer, 2006).

La salida de información del ST se organiza en relación a los segmentos internos y externos del globo pálido, describiéndose la vía directa e indirecta (Den Dunnen, 2013) (Figura 2). La vía directa está formada por neuronas estriatales gabaérgicas que contienen la sustancia P y proyectan de manera monosináptica al GPi y a la SNr. Por otro lado, la vía indirecta está formada por neuronas estriatales grabaérgicas que contienen encefalina y proyectan de manera polisináptica al GPi y a la SNr a través de una secuencia de conexiones que incluyen al GPe y al NST. Además, estudios recientes han demostrado la existencia de una vía hiperdirecta que está formada por la corteza, el NST y el globo pálido. Esta vía posee efectos excitatorios en los núcleos de salida de los ganglios basales y es más rápida que las otras vías (Nambu y col., 2002). Debido al déficit dopaminérgico existente en la EP, se produce una potenciación de la llamada vía indirecta o “inhibidora” de la selección del programa motor sobre la directa o “facilitadora” de movimiento. La falta de dopamina se traduce en una hiperactividad del NST, el cual envía proyecciones excitadoras a las puertas de salida de la vía motora (GPi y SNr). Este complejo manda entonces señales inhibitorias al tálamo, produciendo una inhibición tálamo-cortical (Martínez-Fernández y col., 2016).

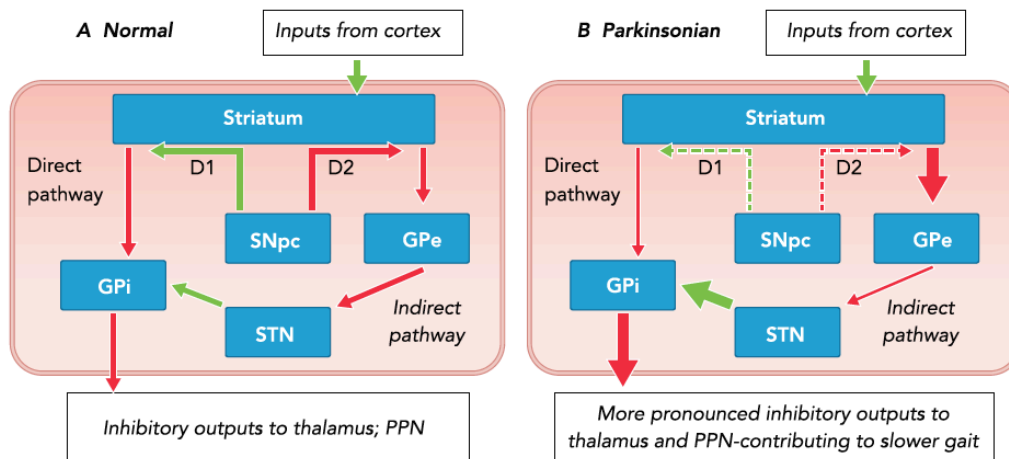


Figura 2. Esquema de las vías directa e indirecta en pacientes normales (A) y con la enfermedad de Parkinson (B). En la imagen las flechas verdes representan proyecciones excitatorias y las rojas inhibitorias (Peterson y Horak, 2016).

Los síntomas de la EP aparecen cuando se pierde aproximadamente el 50% de la dopamina de la SNpc y cerca del 80% de la dopamina estriatal (Cheng y col., 2012). Desde un punto de vista clínico, la EP se caracteriza por la presencia de la triada motora: lentitud de movimientos o bradiquinesia, temblor en reposo, que es típicamente grosero y de gran amplitud; y rigidez, característica en rueda dentada, razón por la cual es estudiada como un trastorno motor. Sin embargo, en las últimas décadas ha aumentado el número de manifestaciones no motoras como la apatía, la disfunción olfatoria, el deterioro cognitivo, disfunción autonómica o desordenes del sueño, entre otros (De Virgilio y col., 2016; Martínez-Fernández y col., 2016).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOPATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

A día de hoy, se sabe que la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después de la enfermedad de Alzheimer, que cursa con una incidencia de entre 10-18 casos por cada 100.000 personas al año. Existen varios factores de riesgo en la población, entre ellos destaca el género, teniendo una prevalencia mayor en hombres con un ratio hombre:mujer de aproximadamente 3:2, lo que ha sugerido un posible efecto protector de los

estrógenos. Por otro lado, se trata de una enfermedad de distribución universal aunque se han sugerido diferencias étnicas, con un mayor riesgo en poblaciones hispanas (Martínez-Fernández y col., 2016; Van Den Eeden, 2003). No obstante, el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EP es la edad. Como consecuencia del envejecimiento popular y el incremento en la esperanza de vida, el número de gente con EP se espera que se incremente en más del 50% en el 2030.

La EP se puede clasificar en esporádica o idiopática y de origen genético. La EP esporádica o idiopática es la de mayor prevalencia y suele aparecer pasados los 65 años, por lo que el envejecimiento es su principal factor de riesgo. Al contrario, el Parkinson de inicio joven, también conocido como Parkinson genético, ya que está causado por una mutación genética específica, representa solo un 10% de los casos y lo sufren personas menores de 40 años (Farrer, 2006; Martínez-Fernández y col., 2016). Se han descrito mutaciones en 7 genes involucrados en la aparición de Parkinson genético. La primera mutación identificada fue en el gen SNCA (PARK1), el cual codifica para la proteína α -sinucleína; y por lo tanto, su mutación provoca la formación de los cuerpos de Lewy. Otras mutaciones implicadas son las que se encuentran el gen LRRK2 (PARK 8) que codifica para una proteína quinasa y cuando se encuentra mutado, aumenta la actividad quinasa y la autofosforilación. El gen UCHL1 (PARK 5) codifica para la ubiquitina carboxil-hidroxilasa 1, que tiene un papel importante en la proteólisis dependiente de ubiquitina, por lo que su disfunción produce el agregado de proteínas (Maraganore y col., 2004). PRKN (PARK2) que codifica para la parkina, una proteína ubiquitina-E3 ligasa que está involucrada en la destrucción de los cuerpos de Lewy, por lo que una mutación en este gen modifica la actividad de esta ligasa. PINK1 (PARK6) que codifica una proteína que se localiza en las mitocondrias y que su mutación incrementa la susceptibilidad a las especies reactivas de oxígeno (ROS). DJ-1 (PARK7) que codifica para una proteína implicada en el estrés oxidativo (EO), actuando como una chaperona para proteínas como la α -sinucleína. Y por último, también se identificó el gen PARK3, que codifica para la enzima sepiapterina reductasa (SPR) que está involucrada en la biosíntesis de dopamina, aunque esta mutación no ha sido totalmente establecida (Farrer, 2006; Pankratz y Foroud, 2007). Sin embargo, la mutación más común de todas es la del gen que codifica para la parkina, que está presente en el 50% de los casos familiares y en el 15% de los esporádicos (Farrer, 2006; Martínez-Fernández y col., 2016).

Aunque la etiopatogénesis de esta enfermedad todavía no está del todo clara, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas ha sido asociada a una variedad de factores, incluyendo condiciones genéticas, ambientales e inmunológicas (De Virgilio y col., 2016) (Figura 3).

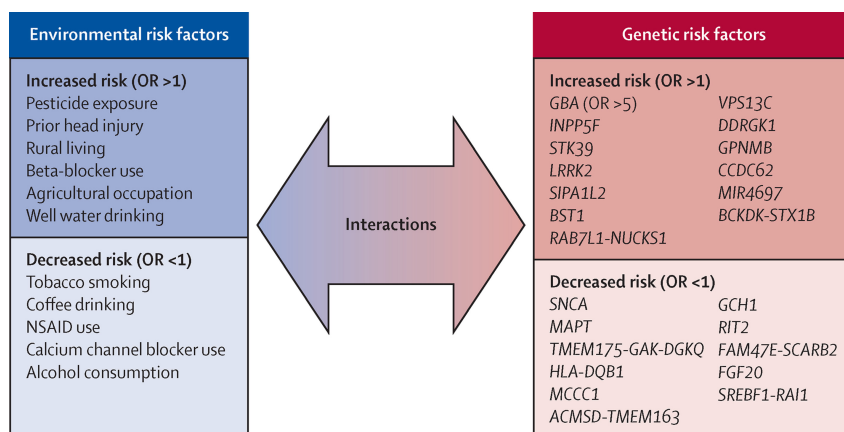


Figura 3. Factores de riesgo que aumentan o disminuyen la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Parkinson (De Virgilio y col., 2016).

Uno de los factores más importantes es la neuroinflamación, que es una condición característica de la patología de la EP. En esta enfermedad se ha encontrado un incremento significativo en los niveles de los componentes inmunes innatos, como las citoquinas, en la SN y en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes. Sin embargo, todavía se desconoce si la neuroinflamación promueve o protege de la neurodegeneración (De Virgilio y col., 2016).

1.1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El diagnóstico de la EP se produce durante la vida del paciente como un diagnóstico de sospecha clínica, ya que para su total confirmación es necesaria la identificación de hallazgos neuropatológicos característicos de la enfermedad, como la pérdida neuronal a nivel de la SNpc y la presencia de cuerpos de Lewy, que sólo se podría realizar en tejido post-mortem. De esta forma, el diagnóstico de la enfermedad se basa en la historia clínica y exámenes físicos, estudiando la presencia de síntomas característicos de la EP, como son la bradiquinesia o la rigidez (Savitt y col., 2006).

Actualmente, también se están midiendo las concentraciones de α -sinucleína, DJ-1, tau y β -amiloide, así como la actividad β -glucocerebrosidasa en el líquido cefalorraquídeo, debido a su potencial como biomarcadores bioquímicos de una etapa temprana de la EP. También es utilizada la tomografía por emisión de positrones (PET) (Figura 4) o la tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT) para medir la reducción del número de terminaciones nerviosas dopaminérgicas en la SNpc que proyectan al ST (De Virgilio y col., 2016; Jankovic, 2008; Martínez-Fernández y col., 2016).

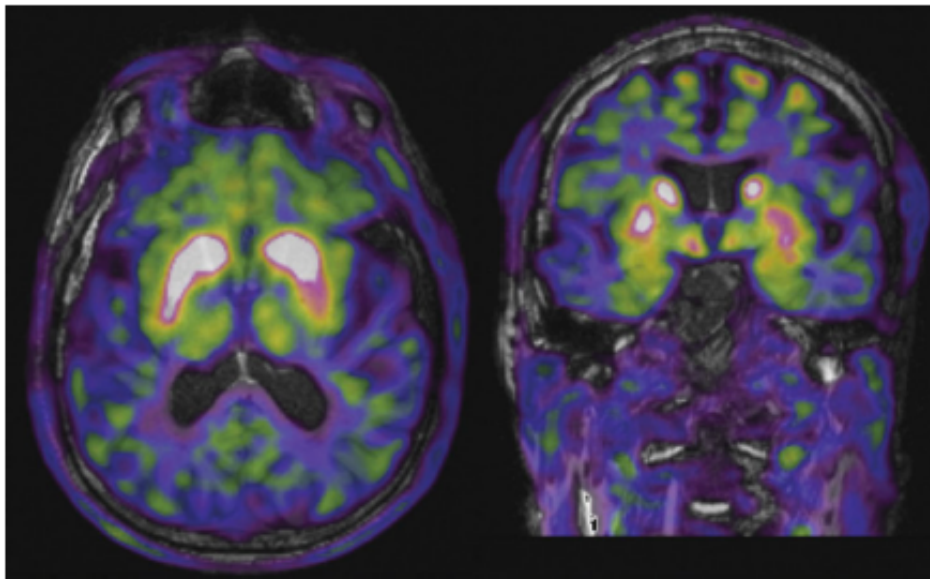


Figura 4. PET de fluorodopa con un patrón de denervación estriatal, en donde se observa un déficit de captación a nivel posterior de ambos putámenes de distribución asimétrica, en este caso existe un predominio del lado izquierdo (Martínez-Fernández y col., 2016).

En el tratamiento de la EP ningún fármaco ha demostrado efecto curativo o neuroprotector, por lo que los tratamientos disponibles tienen un efecto estrictamente sintomático que debe estar adaptado al tiempo de evolución, fase de la enfermedad (precoz vs. avanzada), al tipo de sintomatología presente y la discapacidad que conlleva (motora y no motora). Para paliar los síntomas motores se utilizan fármacos que mejoran las concentraciones intracerebrales de dopamina o estimulan sus receptores. Dentro de este grupo de fármacos se encuentra la levodopa, que es el fármaco más potente para controlar los síntomas de la EP, aunque se asocia con complicaciones motoras como las discinesias, que son movimientos anormales involuntarios (Savitt y col., 2006); por lo que existe un debate acerca de cuándo comenzar este tratamiento. También se utilizan agonistas de la dopamina, que ejercen su efecto

farmacológico activando directamente los receptores de dopamina, evitando su síntesis (Jankovic, 2008); inhibidores de la monoamino oxidasa de tipo B (MAO B), impidiendo la degradación oxidativa de dopamina por esta enzima; inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que reducen la conversión de levodopa a 3-O-metildopa, incrementando los beneficios de la levodopa (Aminoff, 1994); anticolinérgicos que contraatacan el desequilibrio entre la dopamina estriatal y la actividad de la acetilcolina, aunque causan efectos secundarios indeseados (Katzenschlager y col., 2003); y por último, la amantadina, que es un bloqueante de los receptores NMDA de glutamato (Jankovic, 2008). Estos tratamientos deben suministrarse cuando los síntomas causan incapacidad o malestar al paciente, con el objetivo de mejorar la función y la calidad de vida. Como consecuencia de la carencia de fármacos eficaces, a día de hoy existen numerosos ensayos clínicos que tratan de encontrar un fármaco con efecto neuroprotector capaz de detener la enfermedad y el deterioro de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, con el objetivo de aumentar la calidad y esperanza de vida de los pacientes (De Virgilio y col., 2016; Jankovic, 2008; Martínez-Fernández y col., 2016).

Además, existe un interés renovado por los tratamientos quirúrgicos, que ha sido estimulado en parte por la mejora en el entendimiento de la anatomía funcional subyacente al control motor, así como el refinamiento de los métodos y técnicas en neurocirugía, neurofisiología y neuroimagen (Jankovic y Aguilar, 2008)

1.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

1.2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIA CLÁSICO

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema hormonal coordinado con un papel clave en el control de las funciones cardiovasculares, renales y adrenales y que rige el balance de fluidos y electrolitos y de la presión arterial (Carey y Siragy, 2003; Lev-Ran y Porta, 2005). Este sistema es uno de los sistemas hormonales más antiguos y parece haber tenido un papel clave en la supervivencia de los mamíferos y en la evolución humana (Labandeira-Garcia y col., 2012). El SRA clásico, también conocido como SRA circulante o endocrino, comienza con la biosíntesis de la enzima renina por las células yuxtaglomerulares (JG) de las arterias

aferentes renales. La renina corta el angiotensinógeno (AGT), el único precursor conocido para el péptido angiotensina I (AI). Después, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) hidroliza la AI, que está inactivada, en la angiotensina II (AII), que es biológicamente activa (Carey y Siragy, 2003), siendo el péptido efector más importante de este sistema (Villar-Cheda y col., 2014). La acción de la AII está mediada por dos receptores celulares principales: el receptor de AII de tipo 1 (AT1) y el receptor de AII de tipo 2 (AT2) (Figura 5).

El gen humano del receptor AT1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 y codifica para una proteína de entre 40 y 42 KDa. El receptor AT1 es un receptor con siete dominios transmembrana que se encarga de mediar la mayoría de acciones periféricas clásicas de la AII, incluyendo vasoconstricción, retención renal de agua y sal y facilitando la transmisión simpática (Labandeira-Garcia y col., 2012). El gen humano que codifica el receptor AT2 se encuentra en el cromosoma X, dando como resultado una proteína de 363 aminoácidos con siete dominios hidrofóbicos transmembrana (Labandeira-Garcia y col., 2012). Este receptor se expresa ampliamente en los tejidos fetales, sin embargo, después del nacimiento se produce una drástica disminución de su expresión quedando restringido a algunos órganos como el cerebro, la glándula adrenal, el corazón, los riñones, el miometrio y los ovarios (Kaschina y Unger, 2003). La función de estos receptores no se conoce con exactitud, generalmente se cree que la interacción entre la AII y los receptores AT2 ejerce efectos directamente opuestos a aquellos mediados por los receptores AT1, es decir, antagoniza varios efectos de los receptores AT1 (Labandeira-Garcia y col., 2013). Estos receptores se han asociado con la modulación de la proliferación celular, la diferenciación celular, apoptosis y procesos regenerativos. Además, estudios recientes han demostrado que los receptores AT2 se expresan a la baja en varios tejidos adultos sanos, pero están desregulados en circunstancias patológicas (Labandeira-Garcia y col., 2012).

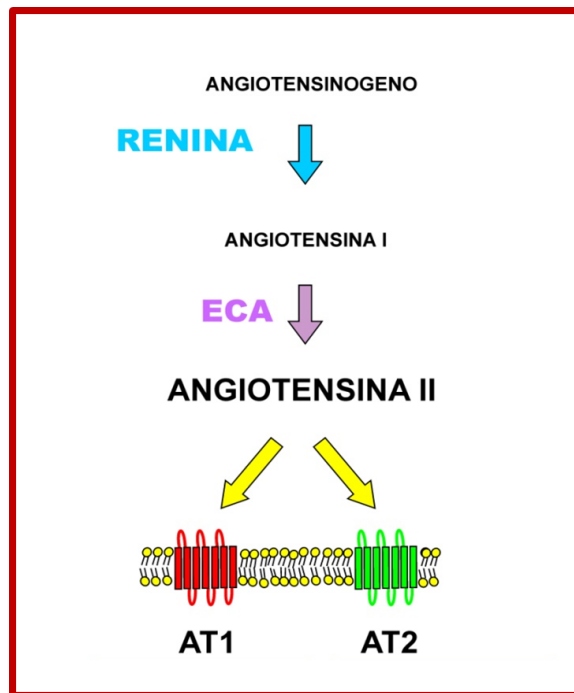


Figura 5. Esquema de los componentes del sistema renina-angiotensina clásico.

1.2.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIA LOCAL

Además del SRA humoral “clásico”, existe un segundo SRA, también conocido como SRA local, tisular o paracrino (Labandeira-Garcia y col., 2014) cuya función y regulación es independiente del sistema circulante (Kumar y col., 2012), aunque también puede interaccionar con él (Kumar y col., 2007). Este sistema local se encuentra en el cerebro, corazón, vasos sanguíneos periféricos, glándulas adrenales y riñones y cuenta con todos los componentes necesarios para la biosíntesis del producto peptídico activo AII, dentro del tejido correspondiente (Carey y Siragy, 2003). Esta forma local de AII está involucrada en cambios patológicos locales ya que regula varias sustancias como factores de crecimiento y citoquinas, que están involucradas en procesos como el crecimiento celular, apoptosis e inflamación (Labandeira-Garcia y col., 2012).

1.2.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIA INTRACELULAR

Recientemente se ha demostrado la existencia de un nuevo nivel del sistema, el SRA intracelular o intracrino. La naturaleza de los componentes del SRA, tales como la presencia de péptidos señal en el AGT y la renina, o la naturaleza transmembrana de ECA, no favorecen el concepto de un sistema intracelular. Sin embargo, el descubrimiento de la existencia de diferentes isoformas glicosiladas de AGT, formas de *splicing* alternativas de renina, formas intracelulares y secretadas de ECA, enzimas alternativas generadoras de AII y la detección de estos componentes intracelularmente, bajo ciertas condiciones, apoyan la hipótesis de un SRA intracelular (Kumar y col., 2007).

Este sistema intracelular se caracteriza por la síntesis y acciones de la AII dentro de una misma célula, aunque sus efectos intracrinicos también pueden llevarse a cabo por la AII internalizada del medio intersticial (Kumar y col., 2012). Se ha demostrado que la renina no glicosilada puede ser internalizada por miocitos cardiacos, llevando a la formación de la AII intracelular y cambios patológicos. Al mismo tiempo, se presentaron evidencias sobre un segundo transcrito de la renina que carecía de la secuencia señal para la secreción y la predicción de ser sintetizada como una enzima activa (Re, 2007). Además, últimamente ha aumentado el interés por la presencia de un SRA intracelular en diferentes orgánulos, intraorgánulos. La presencia de dicho sistema se confirmó en mitocondrias aisladas de la línea celular dopaminérgica híbrida MES 23.5 (Valenzuela y col., 2016). Este SRA intracelular ofrece pues una nueva diana terapéutica, debido a las diferentes habilidades de varios inhibidores para actuar en sitios intracelulares (Re, 2003).

1.2.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSIA Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Con el paso del tiempo ha aumentado el número de evidencias que asocian al SRA con enfermedades relacionadas con la edad como la hipertensión, diabetes o arteroesclerosis. Y aunque se ha observado un SRA local en diferentes áreas del cerebro, la presencia de angiotensina en el sistema nigroestriatal tiene un interés particular para la EP (Labandeira-Garcia y col., 2013).

Se ha demostrado que una sobrerregulación anormal de la AII local induce estrés oxidativo (EO) y exacerba la inflamación, ya que la AII interacciona con los receptores AT1, activando el complejo NADPH-oxidasas. Este complejo es la fuente intracelular más importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) después de las mitocondrias. Se considera que la activación de los receptores AT2 inhibe la activación NADPH-oxidasas y contraataca los efectos nocivos de la activación de los receptores AT1 (Labandeira-Garcia y col., 2012). Este hecho se ha corroborado al estudiar los efectos de la reducción de dopamina en la expresión de receptores de AII y en la activación del complejo NADPH-oxidasas en la SNpc y el ST. La reducción de la dopamina induce un incremento significativo en la expresión de los receptores AT1 y AT2, así como de la actividad del complejo NADPH-oxidasas, el cual se revierte al restaurar la función de la dopamina, lo que corrobora la relación entre dopamina y el SRA (Labandeira-Garcia y col., 2013; Villar-Cheda y col., 2012).

Figura 6. Papel del SRA extracelular en la progresión de la degeneración dopaminérgica (Labandeira-Garcia y col., 2013).

La AII puede producir la degeneración dopaminérgica por diferentes mecanismos (Figura 6). Primero, la AII puede actuar en las neuronas a través de los receptores AT1 y estimular la producción de niveles bajos de ROS intraneuronal a través de la activación de la NADPH-oxidasa neuronal. Además, el ROS derivado de la NADPH puede interaccionar con el ROS derivado de las mitocondrias y con el ROS derivado de otras fuentes como las neurotoxinas dopaminérgicas o la microglía activada, modulando a su vez los niveles de EO. Segundo, la AII puede actuar en la microglía, en la que la activación de la NADPH-oxidasa produce altas

concentraciones de ROS que se libera al medio extracelular y por consiguiente puede afectar a las neuronas. De acuerdo con esto, la AII incrementa el efecto neurotóxico inducido por bajas dosis de neurotoxinas dopaminérgicas y el tratamiento con inhibidores del enzima ECA o bloqueantes de los receptores AT1 reducen significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Labandeira-Garcia y col., 2012, 2013). El SRA está por tanto involucrado en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y consecuentemente relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP), estrechamente asociado a procesos como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y particularmente la activación de la NADPH microglial (Villar-Cheda y col., 2012).

1.3. ANGIOTENSINA 1-7 Y RECEPTOR MAS

A medida que se avanza en el conocimiento del SRA local, se han identificado nuevos componentes y nuevos mecanismos involucrados en su función. Uno de los puntos clave ha sido la identificación de otros péptidos de la angiotensina, entre los que se encuentra la angiotensina 1-7 (A(1-7)) (Labandeira-Garcia y col., 2012).

La A(1-7) está presente como un constituyente endógeno en el cerebro, en áreas como el hipotálamo, la médula oblongada y la amígdala; y es sintetizada mayoritariamente a través de la degradación de la AII por la enzima convertidora de angiotensina II (ECA2). Además, existe una forma indirecta de producción del péptido mediante la AI, en donde también se forma angiotensina 1-9 (A(1-9)) en un paso intermedio (Chen y col., 2012; Jiang y col., 2013) (Figura 7). Este péptido constituye el eje A(1-7)/RMas, que está formado por un receptor ligado a proteína G, denominado receptor Mas (RMas); antagonistas y agonistas selectivos para este receptor y la ECA2. El RMas es una proteína con siete dominios transmembrana codificada por el protooncogen Mas (Santos y col., 2002), que fue descrita hace más de 25 años (Bader y col., 2014). Este receptor ha sido identificado en el cerebro y de manera particularmente elevada en el giro dentado del hipocampo y la corteza piriforme (Wright y col., 2013), pero también mostró localización en la amígdala, los ganglios basales, el tálamo y el hipotálamo.

En la actualidad se han identificado varias vías de señalización como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas y fosfatasa celulares que se encuentran estimuladas por la A(1-7) (Chappell y col., 2014). Además, se sabe que el eje A(1-7)/RMas tiene múltiples acciones (Paul, 2006), y es que se cree que el eje A(1-7)/RMas contrarresta los efectos nocivos que provoca la AII cuando actúa a través de los receptores AT1 atenuando el desarrollo de diferentes enfermedades. Un ejemplo de ello, es que la A(1-7) causa vasodilatación, antagonizando los efectos de vasoconstricción causados por los receptores AT1, efecto que parece estar mediado por la vía del NO (Iwai y Horiuchi, 2009).

Basándose en la expresión de la proteína del RMas en el córtex y el sistema límbico, la señalización de la A(1-7) debe de tener también un papel en la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria y la emoción (Freund y col., 2012) por lo que es un sistema de gran interés para la EP.

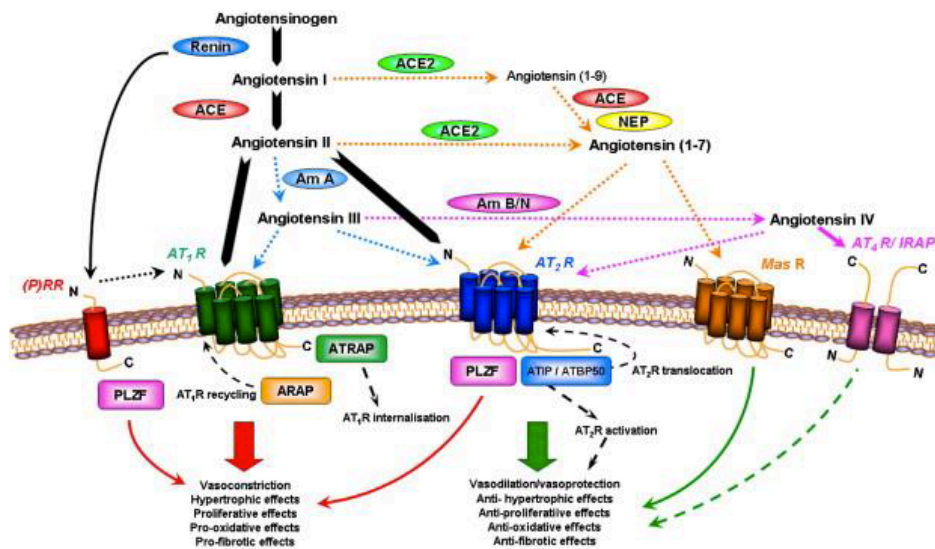


Figura 7. Componentes del sistema renina-angiotensina (modificado de Jones y col.,2008).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La existencia de un sistema renina angiotensina (SRA) local cerebral ha sido un tema controvertido desde que en 1971 fue descubierto por Ganten (Labandeira-Garcia y col., 2012). Los resultados mostraban bajos niveles de renina, por debajo de los límites detectables en algunas técnicas inmunohistoquímicas y otros ensayos estándar. Sin embargo, posteriormente se observó renina inmunoreactiva en neuronas y células de la glía en numerosas áreas de cerebros de rata y ratón, así como en todas las áreas del cerebro humano examinadas, incluyendo los ganglios basales mediante técnicas de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y técnicas fluorescentes (Fuxe y col., 1980). Estos hechos fueron posteriormente corroborados mediante el uso de modelos transgénicos (Labandeira-Garcia y col., 2012).

El SRA ejerce sus acciones clásicamente a través del péptido efector angiotensina II (AII), mediante su unión a los dos receptores principales, el receptor de AII de tipo 1 (AT1) y el receptor de AII de tipo 2 (AT2) (Cooper y col., 2001). La AII cerebral juega un papel fundamental en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Parkinson (EP), puesto que está involucrada en la modulación del estrés oxidativo (EO) y la neuroinflamación, dos procesos clave desencadenantes de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) en el transcurso de la enfermedad (Labandeira-Garcia y col., 2012, 2013; Villar-Cheda y col., 2014). El descubrimiento reciente de nuevos componentes de este sistema, destacando el péptido angiotensina 1-7 (A(1-7)) y su receptor, el receptor Mas (RMas), han incrementado el interés por sus funciones e implicaciones en la EP (Labandeira-Garcia y col., 2012). Por lo que el objetivo principal de este trabajo es el estudio del eje A(1-7) y el RMas en neuronas dopaminérgicas en cultivo, utilizando para ello la línea celular dopaminérgica de rata N27.

En este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de la línea celular dopaminérgica de rata N27 y su diferenciación a neuronas dopaminérgicas.
2. Caracterización de la línea celular N27 diferenciada a neuronas dopaminérgicas y confirmación de la presencia de los principales receptores de AII, AT1 y AT2.
3. Estudio de la expresión del receptor Mas en las neuronas dopaminérgicas diferenciadas de la línea celular N27 mediante diferentes técnicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

Se utilizó una línea celular de neuronas dopaminérgicas de rata obtenida del tejido mesencefálico de embriones de rata en estadio 12 de gestación (E12) y transfectada con SV40 para inmortalizarla. Esta línea clonal de células se conoce como 1RB₃AN₂₇. Las células fueron cultivadas en un medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), manteniéndose a 37°C en un incubador con aporte de CO₂ al 5% (Adams y col., 1996). Las células fueron sembradas a una densidad de entre 0,4 - 0,8 x 10⁶ /cm² en placas de 35 mm previamente tratadas con poli-L-lisina (100µg/ml; Sigma). 24 horas después de ser sembradas, se añadieron compuestos para estimular su diferenciación, que se componen de dibutiril-cAMP (1mM; Sigma) (Adams y col., 1996) y dihidroepiandrosterona (DHEA) (Sigma D063 1mg/ml en etanol) (Clarkson y col., 1998). Se testaron diferentes concentraciones de DHEA para los experimentos (60, 30 y 15 µl/ml) y diferentes tiempos para la diferenciación (24 y 48 horas).

Para comprobar el nivel de diferenciación de las células se midió la expresión de dos marcadores de las neuronas dopaminérgicas: la tiroxina hidroxilasa (TH) y el transportador de dopamina (DAT) por Western Blot (WB).

3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

3.2.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las células fueron recogidas en tampón RIPA (del inglés, *Radio Immunoprecipitation Assay*) con inhibidores de proteasas (Sigma). El proceso fue repartido en 2 veces para asegurar la total recogida de las células, y posteriormente, las muestras fueron sonicadas para asegurar una mayor homogenización.

3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína presente en el lisado de la línea celular N27 fue determinada mediante el método del ácido bicinconínico de Pierce (*Pierce BCA Protein Assay kit*). Este método combina la bien conocida reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión Cu^{1+} utilizando un único reactivo que contiene ácido bicinconínico (Smith y col., 1985).

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, cargando 25 μl de muestra o de una serie de diluciones de concentración conocida de la proteína sérica bovina (BSA), de 0 a 2.000 $\mu\text{g/ml}$, como recta patrón donde se extrapolaron los datos de absorbancia de las muestras, obteniendo la concentración de las mismas (Smith y col., 1985). Tras una incubación de entre 20 y 30 minutos a 37°C se leyó la absorbancia a 562nm en un espectrofotómetro (Infinite M200, TECAN).

3.2.3. WESTERN BLOT

Las proteínas se desnaturalizaron mediante la incubación a 96°C durante 4 minutos en un baño térmico y cantidades iguales de las proteínas fueron separadas en geles de Bis-Tris poliacrilamida al 5-10% utilizando la técnica de electroforesis SDS-PAGE durante aproximadamente 1 hora y media a 120 V y a 0.04 A. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad, durante 2 horas a 90 V y 0.30 A.

Para comprobar la correcta transferencia se tiñeron las membranas con rojo Ponceau (Sigma) y posteriormente se procedió con el bloqueo de las membranas con leche desnatada deshidratada al 10% durante 1 hora. Finalmente, las membranas fueron incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios: monoclonal anti-tirosina hidroxilasa de ratón ([TH], T2928, 1:50, Sigma), anti-transportador de dopamina de cabra ([DAT], sc-1433, 1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-AT1 de cabra (1:200, sc31118, Santa Cruz Biotechnology), anti-AT2 de conejo (1:200/1:50, sc9040, Santa Cruz Biotechnology), anti-RMAS de conejo

(1:200, AAR-013, Alomone); todos diluidos en leche desnatada deshidratada al 5%. La especificidad de los anticuerpos AT1 y AT2 utilizados en este trabajo fueron validados y confirmados en el laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Santiago de Compostela a través de WB usando lisados de células comerciales HEK293T que fueron transfectadas con un plásmido que codifica para el receptor AT1 o AT2 unidos a una proteína de fusión DDK (TA50011, Origene, Rockville, MD, USA) (Valenzuela y col., 2016). Además, el anticuerpo RMas utilizado también fue validado y confirmado a través de una inmunohistoquímica por la ausencia de marcaje en tejidos de ratones deficientes en RMas (KO RMas) (Freund y col., 2012).

Tras varios lavados con PBS Tween 20 al 1% (PBS-T), se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-cabra y anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) en leche desnatada deshidratada al 5% con PBS-T.

Para visualizar las bandas correspondientes a la inmunoreactividad de los anticuerpos, se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Luminata Crescendo Western HRP Substrate, Millipore) y se utilizó un sistema de detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager Chemidoc XRS System, BioRad).

Por último, se reincubaron las membranas con un anticuerpo contra la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ([GADPH], G9545, 1:50000, Sigma) como control de carga. Los resultados fueron normalizados y expresados de forma relativa con respecto a la banda de la GADPH.

3.3. INMUNOCITOQUÍMICA

Para su procesamiento por técnicas inmunocitoquímicas, los cultivos celulares procedentes de la línea celular N27 fueron fijados con paraformaldehído al 4%.

Se realizaron técnicas de doble inmunofluorescencia en las que los cultivos fueron incubados, durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente, con suero normal de la misma especie que el anticuerpo secundario (en este caso se utilizó siempre suero de burro) para bloquear los

antígenos inespecíficos presentes en las células, junto con seroalbúmina bovina (BSA) y Triton X-100 para permeabilizar la membrana celular. A continuación, fueron incubados durante toda la noche en agitación y a 4°C, con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-AT1 de cabra (1:200, sc31118, Santa Cruz Biotechnology), anti-AT2 de conejo (1:200/1:50, sc9040, Santa Cruz Biotechnology), anti-RMAS de conejo (1:200, AAR-013, Alomone) y anti-TH de oveja (1:1000/1:250, AB1542, Millipore), marcador de neuronas dopaminérgicas; junto con el suero, la seroalbúmina y el Triton X-100.

Al día siguiente, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios marcados con distintos fluoróforos en una concentración 1:200 durante 2 horas y media en la oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, los núcleos fueron marcados con Hoeschst 33342 y se procedió al montaje de los portaobjetos mediante la utilización de medio de montaje (Inmunomont, ThermoFisher)

Las neuronas fueron visualizadas con un microscopio confocal (AOBS-SP5X, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). Se obtuvieron imágenes mediante un método de escáner secuencial y tres láseres diferentes para evitar la excitación simultánea y posibles sobreposiciones.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como medias \pm SEM. Se analizó la comparación de dos grupos mediante el test estadístico *t* de Student y se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con SigmaStat 2.0 de Jandel Scientific (San Rafael, CA).

4. RESULTADOS

4.1. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA N27 A NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Para llevar a cabo la diferenciación de la línea N27 a neuronas dopaminérgicas, se realizaron diferentes experimentos en los que se modificaron cuatro criterios diferentes: agentes de diferenciación, concentración, tiempo de incubación y diluyente de los compuestos.

Primero, se añadieron los diferentes agentes diferenciadores al medio de cultivo, siempre 24 horas después de su siembra, llevándose a cabo tres experimentos en paralelo:

1. Células con medio de cultivo y dibutiril-cAMP (1mM; Sigma).
2. Células con medio de cultivo y dihidroepiandrosterona (DHEA) (Sigma D063 1mg/ml).
3. Células con medio de cultivo, dibutiril-cAMP (1mM; Sigma) y DHEA (Sigma D063 1mg/ml).

Después de 24 horas de incubación, se obtuvo como resultado que en el primer tratamiento había una confluencia de aproximadamente el 95-100%, sin embargo, no se notaban cambios en su morfología. En las segundas, la confluencia era de aproximadamente el 60%, y se comenzaba a notar un poco la diferenciación neuronal. Por último, ya en las terceras, aunque la confluencia fue la más baja que se obtuvo, de aproximadamente un 20%, se notaba una gran diferenciación en las células indicada por un notable cambio en su morfología. Debido a estos resultados, se decidió continuar adelante con el tratamiento de dibutiril-cAMP y DHEA.

En segundo lugar, a pesar de que autores como Clarkson y col, 1998; indicaban en sus publicaciones que el DHEA había sido diluido en etanol, se prosiguió a probar su dilución tanto en etanol como en metanol para comprobar diferencias en su efecto. Sin embargo, no se detectó ninguna diferencia entre ambos, y dada la mayor toxicidad del metanol, se procedió con etanol para los siguientes experimentos.

Por último, se testaron diferentes concentraciones del agente diferenciador DHEA combinado con dibutilil-cAMP, y diferentes tiempos de incubación de forma simultánea como se muestra en la Tabla 1, para saber cual era la mejor combinación.

Concentración de DHEA ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de incubación (horas)
60	24/48
30	24/48
15	24/48

Tabla 1. Tabla con concentraciones de DHEA y tiempos de incubación utilizados para optimizar la diferenciación dopaminérgica de la línea celular N27.

Como resultado de este experimento, se obtuvo que en las placas que se trataron con un tiempo de incubación de 24 horas, la confluencia disminuía al aumentar la concentración de DHEA. Por lo que las células que experimentaban un cambio de morfología notable, que eran aquellas que habían sido tratadas con una concentración de DHEA de 60 $\mu\text{g/ml}$, tenían una confluencia muy baja para poder continuar con los siguientes experimentos. En cuanto a los resultados con un tiempo de incubación de 48 horas, se obtuvo un aumento del cambio de morfología tanto en las placas tratadas con 15 como con 30 $\mu\text{g/ml}$. Como consecuencia de estos resultados, se consideró que la concentración ideal en nuestros experimentos para la diferenciación de las células N27 era de 15 $\mu\text{g/ml}$ y un tiempo de incubación de 48 horas como se muestra en la Figura 8, de manera que se obtenía la mayor confluencia posible, necesaria para los experimentos posteriores; y la mayor diferenciación a neuronas dopaminérgicas observada en todas las condiciones estudiadas.

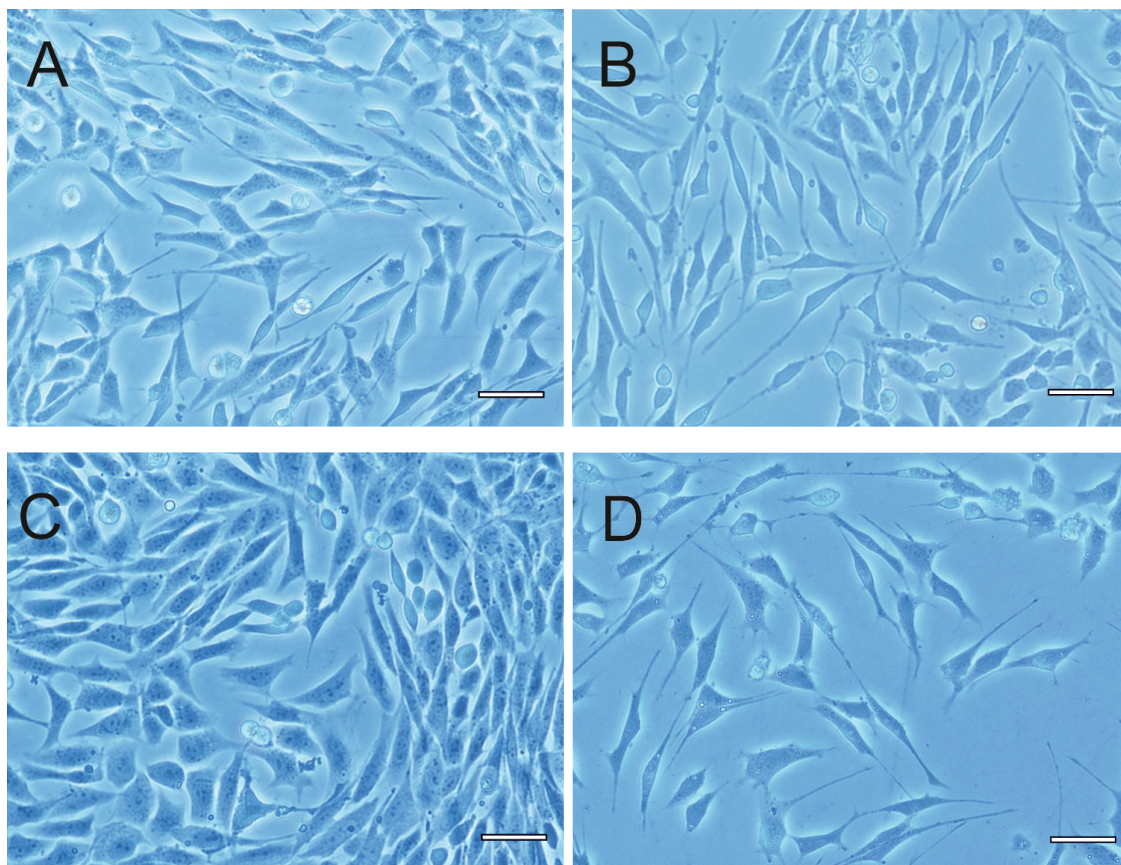


Figura 8. Fotografías de las células 1RB₃AN₂₇. Las células tratadas con DHEA 15 µg/ml más dibutilil durante 24h (B) muestran un ligero cambio de morfología en comparación a su control (A). Las células que fueron tratadas durante 48h (D) muestran una morfología característica de neuronas dopaminérgicas diferenciadas en comparación con su control (C). Escala: 50 µm.

Como ya se indicaba en el apartado 3 de este trabajo, la tirosina hidroxilasa (TH) y el transportador de dopamina (DAT), son marcadores de diferenciación de neuronas dopaminérgicas, por lo que mediante Western Blot (WB) medimos la expresión de estos marcadores para determinar el grado de diferenciación de las células N27. Para saber si este aumento era significativo, se realizó un test t de Student en el que se compararon los valores obtenidos de las muestras control y tratadas en relación con el gen control GADPH. Como resultado, se obtuvo que tanto la TH como el DAT aumentan significativamente después de realizar a las células un tratamiento de diferenciación con los compuestos dibutilil (1mM) y DHEA 15 µg/ml durante 48h, confirmando que se produce la diferenciación de las células N27 a neuronas dopaminérgicas (Figura 9).

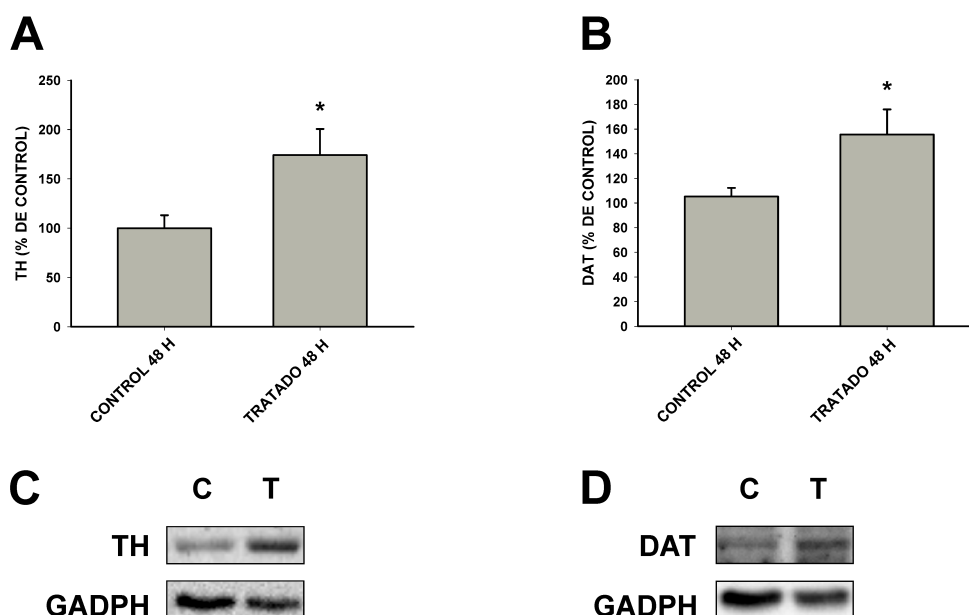


Figura 9. Aumento de TH (A, C) y DAT (B, D) en las muestras tratadas respecto a las control visualizado mediante WB. Este aumento fue comprobado por un test t de Student, en el que se midieron los valores con relación al gen control GADPH. TH: tirosina hidroxilasa. DAT: transportador de dopamina. GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN N27

Una vez confirmada la diferenciación a neuronas dopaminérgicas de la línea N27, se procedió a la caracterización del SRA. Para determinar la presencia de los principales receptores de AII (AT1 y AT2), se realizó una inmunofluorescencia doble y se visualizó por microscopía confocal, obteniendo series de imágenes confocales cada 0,7 μm a nivel del eje-Z mediante un método de escáner secuencial.

En las neuronas dopaminérgicas, identificadas por su inmunoreactividad a la TH, se confirmó la presencia de ambos receptores como se muestra en la Figura 10. Estos receptores se

encontraron tanto a nivel nuclear como citoplasmático en las neuronas dopaminérgicas procedentes de la línea N27, corroborando la existencia del SRA en estas células.

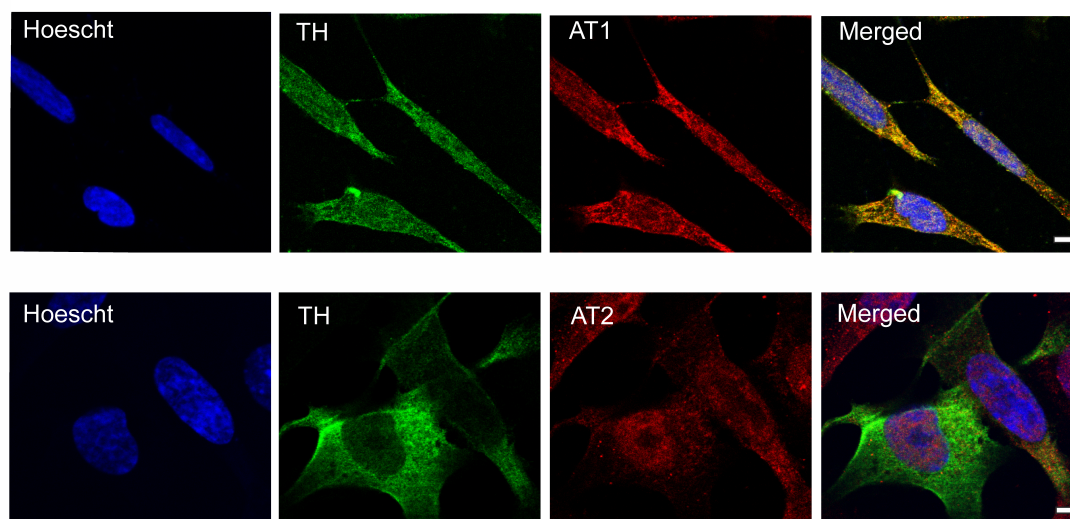


Figura 10. Inmunocitoquímica que demuestra la presencia de AT1 (A) y AT2 (B) en las células N27 diferenciadas a neuronas dopaminérgicas. Escala: 5 μ m.

4.3. PRESENCIA DEL RECEPTOR MAS EN LAS N27 DIFERENCIADAS

Una vez confirmada la presencia de los principales componentes del SRA en las neuronas dopaminérgicas de la línea N27, se procedió a estudiar la posible presencia del receptor de A(1-7), el RMas, mediante una inmunofluorescencia doble, seguida de una visualización con microscopía confocal. Se observó la presencia del RMas, presentando un intenso marcaje del RMas predominantemente a nivel citoplasmático como se demuestra en la Figura 11. Lo que demuestra que esta línea celular diferenciada a neuronas dopaminérgicas presenta componentes del SRA, en concreto el eje protector A(1-7)/RMas.

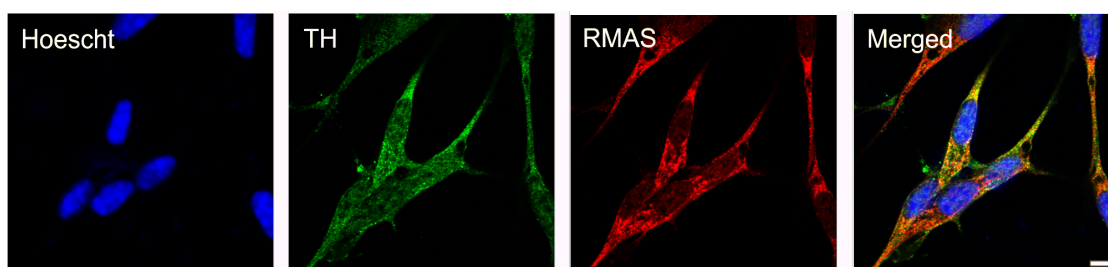


Figura 11. Presencia de RMAS en las células N27 diferenciadas a neuronas dopaminérgicas realizado por inmunocitoquímica. Escala: 5 μ m.

4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Una vez observada la localización de los receptores del SRA de AII y de A (1-7) se procedió a su confirmación mediante el análisis de su expresión proteica por la técnica WB.

Se analizó la expresión de los principales receptores de AII (AT1 y AT2) en lisados de células control y células diferenciadas N27. Observamos una banda predominante de peso molecular 75 kDa correspondiente con el receptor AT1 (Figura 12A) en su forma glicosilada, que aumenta su expresión con la diferenciación. Igualmente, el receptor AT2 presenta una banda inmunoreactiva de aproximadamente 41 kDa (Figura 12B) que se corresponde con el tamaño de la proteína, y que varía con la diferenciación, aumentando su expresión (Figura 12D). Estos resultados confirman la expresión de los dos receptores principales de AII en neuronas dopaminérgicas procedentes de la línea N27 por la técnica de WB.

De igual forma, se estudió la presencia del nuevo componente del SRA, el RMas, en lisados de las células controles y tratadas N27. Como resultado, se obtuvo una banda de aproximadamente 37 kDa, como se muestra en la Figura 12C, que indica una disminución de la expresión del receptor de forma no significativa con la diferenciación de la línea N27 (Figura 12D).

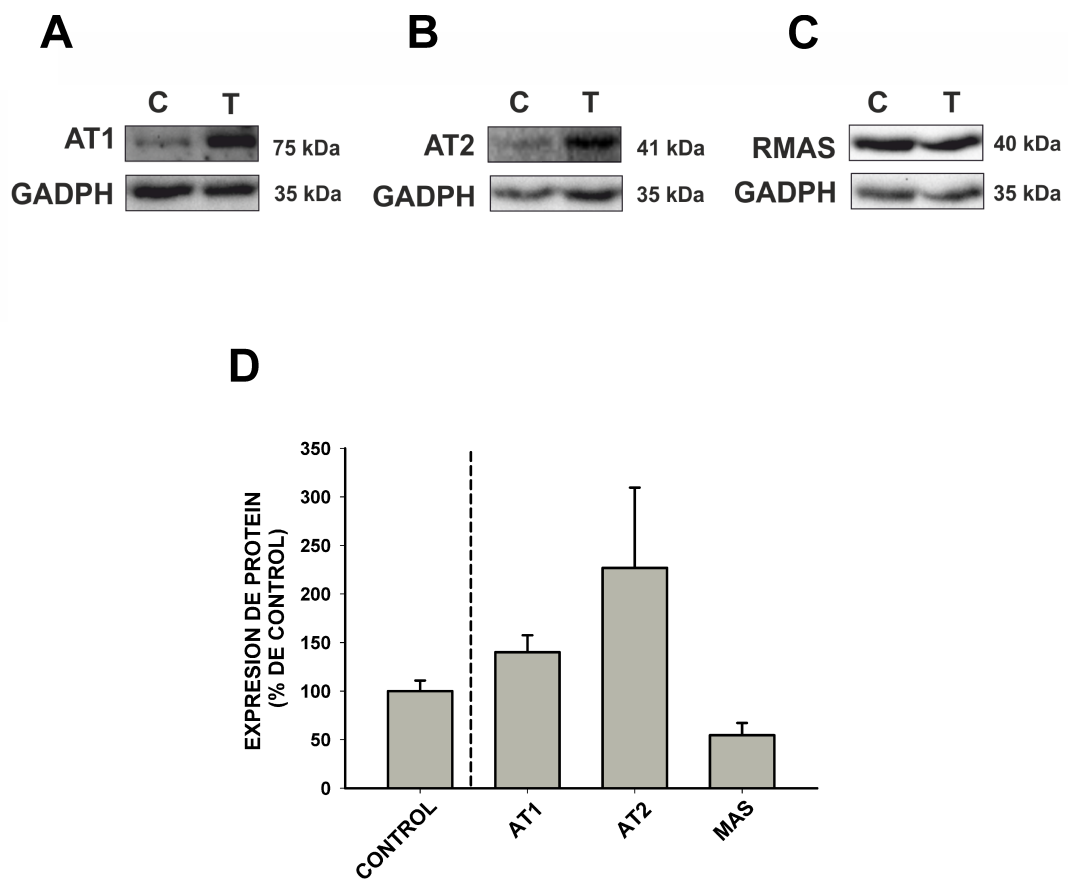


Figura 12. Presencia de los receptores de AII, AT1 (A) y AT2 (B), y del RMas (C) por WB, acompañado del análisis de la expresión proteica de estos componentes del SRA en la línea celular N27 (D).

5. DISCUSIÓN

5.1. PUESTA A PUNTO DE LA LÍNEA CELULAR N27

Actualmente no se conocen con exactitud las causas que provocan la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo que se produce en la enfermedad de Parkinson (EP). Se cree que la neurodegeneración ocurre en respuesta a una mezcla de mecanismos deletéreos que tienen lugar tanto dentro de las neuronas que degeneran, como fuera de ellas. Entre los mecanismos que afectan cabe destacar el estrés oxidativo (EO), la agregación de proteínas por defectos en la vías de degradación (proteosoma y autofagia), y la disfunción mitocondrial (Hirsch y col., 2013). Esto hace que a lo largo de los años los esfuerzos se hayan centrado en la búsqueda de un buen modelo que reproduzca la enfermedad con el objetivo de averiguar las causas de dicha degeneración.

Se han desarrollado distintos modelos de la EP basados en modelos de experimentación en animales, cultivos primarios mesencefálicos y diferentes líneas celulares. Los modelos animales constituyen una herramienta fundamental para el estudio de los mecanismos patogénicos y el desarrollo de estrategias terapéuticas de las enfermedades humanas. Sin embargo, hasta el día de hoy ninguno ha conseguido reproducir al 100% lo que sucede en el cuerpo humano y es que, en el caso de los modelos murinos, ampliamente utilizados para el estudio de la EP, no existe ninguna toxina o modelo genético que reproduzca completamente la patofisiología observada en humanos. Por otro lado, los primates raramente se usan a pesar de sus semejanzas anatómicas, fisiológicas y comportamentales, debido a su elevado coste e implicaciones éticas (Potashkin y col, 2012). En cuanto a los cultivos mesencefálicos primarios, son difíciles de preparar, mantener y transfectar (Schlachetzki y col., 2013).

Una alternativa a estos modelos es el uso de líneas celulares, que son líneas inmortalizadas de células procedentes de un tejido en las que se pueden evaluar muchas de las alteraciones que ocurren a nivel celular y molecular. Para el estudio de la EP se generaron diferentes líneas celulares, siendo la más usada la línea celular SH-SY5Y. Esta línea celular deriva de la biopsia de un tumor metastático de hueso (Kovalevich y Langford, 2013) y su uso de forma indiferenciada no la convierte en un buen modelo de estudio de la EP, ya que solamente expresa marcadores neuronales inmaduros. Además, su diferenciación con un determinado tratamiento da como resultado un fenotipo neuronal más dopaminérgico (Krishna y col.,

2014), sin embargo, estos neuroblastos son catecolaminérgicos, por lo que nunca van a representar un fenotipo dopaminérgico al 100%, dificultando el estudio de la enfermedad.

La opción que proponemos en este trabajo es la línea celular N27; esta línea fue obtenida de tejido mesencefálico de embriones de rata (E12) y fue inmortalizada con SV40 (Clarkson y col., 1998). Sin embargo, estas líneas celulares carecen de las características de neuronas adultas, por ello es necesaria su diferenciación a neuronas dopaminérgicas adultas para su uso como herramienta de estudio de la EP. Durante el desarrollo experimental de este trabajo conseguimos diferenciar la línea celular N27 a neuronas dopaminérgicas adultas mediante el uso de dos compuestos: dibutiril-cAMP, que inhibe el crecimiento celular e incrementa la expresión de marcadores neuronales acompañado de cambios en la morfología celular (Adornetto y col., 2013); y DHEA, que aumenta la diferenciación morfológica inducida por el dibutiril-cAMP (Clarkson y col., 1998). Probamos distintas concentraciones del compuesto DHEA, y llegamos a una concentración de 15 µg/ml en 48 horas puesto que concentraciones mayores provocaban un gran porcentaje de muerte celular, y concentraciones más bajas no producían el efecto morfológico y bioquímico característico de las neuronas dopaminérgicas adultas. En cuanto al tiempo de incubación de los compuestos, observamos que 24 horas de incubación provocaban una alteración de las células que se normalizaba con una incubación más larga (48 h).

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA LÍNEA DOPAMINÉRGICA N27. PRESENCIA DEL RECEPTOR MAS

Una vez establecido un protocolo de diferenciación de la línea celular N27 a neuronas dopaminérgicas, se procedió a la caracterización del sistema renina-angiotensina (SRA) en este modelo. Mediante distintas técnicas, se confirmó la presencia de los dos tipos de receptores principales de angiotensina II (AII): receptor de AII tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2). Esto concuerda con estudios previos en los que se demostró la presencia de un SRA local en cultivos primarios mesencefálicos, así como en tejido cerebral, sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) y estriado (ST), de roedores y primates, incluyendo humanos (Garrido-Gil y col., 2013, 2017; Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2008). Por otro lado, su análisis

por Western Blot (WB) demostró un incremento de la expresión de ambos receptores en células N27 diferenciadas. Estos datos concuerdan con lo observado en un estudio anterior, en el cual utilizaban neuroblastomas, concretamente las células NG108-15. Las NG108-15 expresaban un incremento en los niveles de receptores de AII en comparación con las células indiferenciadas. Además, una vez las células estaban diferenciadas, los receptores AT2 se expresaban de forma predominante, hecho que sugirió que este tipo de receptores estaban expresados como consecuencia de la diferenciación neuronal, aunque la magnitud del incremento variaba según el método de diferenciación utilizado (Seidman y col., 1996).

Además de los componentes principales del SRA, también se han identificado otros componentes descritos con posterioridad, como es el caso del receptor de prorenina (PRR) y su efecto en cultivos primarios mesencefálicos de rata (Valenzuela y col., 2010). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la posible presencia de los nuevos componentes recientemente descritos en el sistema dopaminérgico, como el péptido angiotensina 1-7 (A (1-7)) y su receptor principal, el receptor Mas (RMas) (Santos y col., 2003). En este trabajo hemos demostrado la presencia del RMas en neuronas dopaminérgicas diferenciadas procedentes de la línea N27 mediante diferentes técnicas experimentales y su ligera disminución con la diferenciación. A pesar de que en estudios sobre la adipogénesis, los niveles de este receptor aumentaban con la diferenciación (Than y col., 2013), no se ha establecido ningún patrón sobre su expresión en la diferenciación de células que se encuentran en el cerebro. Por lo que el incremento de los receptores AT2 durante la diferenciación, sugiere que estos receptores tienen un mayor papel en el proceso de diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la línea N27 que el que podrían tener el receptor AT1 y RMas.

El receptor Mas es un importante neuromodulador que se ha identificado en el hipocampo, la amígdala, el córtex y el núcleo hipogloso, así como en áreas de la médula relacionadas con el sistema cardiovascular y en el cerebro anterior de ratas Wistar (Becker y col., 2007). De esta forma, la presencia del RMas en las neuronas dopaminérgicas diferenciadas procedentes de la línea N27 convierte este modelo en una valiosa herramienta para el estudio de los efectos del eje A(1-7)/RMas en los cambios celulares que ocurren durante la degeneración dopaminérgica en la EP y su posible modulación para contrarrestar los efectos deletéreos de la AII.

6. CONCLUSIONES

Como resultado de la realización de este proyecto, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento de la línea celular N27 con DHEA 15 µg/ml y dibutilil 1mM con un tiempo de incubación de 48 h, diferencia a los neuroblastos N27 a neuronas dopaminérgicas. Esta diferenciación fue confirmada por un aumento de los marcadores de neuronas dopaminérgicas, tirosina hidroxilasa (TH) y transportador de dopamina (DAT).
2. Las neuronas dopaminérgicas diferenciadas a partir de la línea celular N27 expresan los receptores principales de angiotensina II (AII), el receptor de AII de tipo 1 (AT1) y el receptor de AII de tipo 2 (AT2).
3. Se ha demostrado la presencia de uno de los nuevos componentes del sistema renina-angiotensina (SRA), el receptor Mas (RMas), principal receptor de la angiotensina 1-7 (A(1-7)), en la línea dopaminérgica N27 diferenciada, convirtiéndola en una herramienta de estudio para entender mejor el brazo protector del SRA y su relación con la enfermedad de Parkinson (EP).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, F. S., La Rosa, F. G., Kumar, S., Edwards-Prasad, J., Kentroti, S., Vernadakis, A., Prasad, K. N. (1996). Characterization and transplantation of two neuronal cell lines with dopaminergic properties. *Neurochemical Research*, 21(5), 619–627.
- Adornetto, A., Pagliara, V., Renzo, G. Di, & Arcone, R. (2013). Polychlorinated biphenyls impair dibutyl cAMP-induced astrocytic differentiation in rat C6 glial cell line. *FEBS Open Bio*, 3, 459–466.
- Aminoff, M. J. (1994). Treatment of Parkinson's disease. *West J Med*, 161(3), 303–308.
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. and Santos, R. (2014). Mas and Its Related G Protein-Coupled Receptors, Mrgprs. *Pharmacological Reviews*, 66(4), pp.1080-1105.
- Becker, L. K., Etelvino, G. M., Walther, T., Santos, R. A. S., & Campagnole-Santos, M. J. (2007). Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1416–H1424.
- Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*.
- Chappell, M. C., Marshall, A. C., Alzayadneh, E. M., Shaltout, H. A., & Diz, D. I. (2014). Update on the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas receptor axis: Fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Frontiers in Endocrinology*.
- Chen, S. L., Wu, Y. X., Huang, Y. Y., Fang, M., He, J. G., Chen, Y. L., Ma, H. (2012). AVE0991, a nonpeptide compound, attenuates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via induction of heme oxygenase-1 and downregulation of p-38 mapk phosphorylation. *International Journal of Hypertension*, 2012.
- Cheng, H., Ulane, C. and Burke, R. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*, 67(6), pp.715-725.
- Clarkson, E. D., Rosa, F. G., Edwards-Prasad, J., Weiland, D. A., Witta, S. E., Freed, C. R., & Prasad, K. N. (1998). Improvement of neurological deficits in 6-hydroxydopamine-lesioned rats after transplantation with allogeneic simian virus 40 large tumor antigen gene-induced immortalized dopamine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1265–1270.
- Cooper, M. E., Webb, R. L., & de Gasparo, M. (2001). Angiotensin receptor blockers and the

- kidney: possible advantages over ACE inhibition? *Cardiovasc Drug Rev*, 19(1), 75–86.
- De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., Rizzo, M. I., Gallo, A., de Vincentiis, M. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmunity Reviews*.
- Den Dunnen, W. F. A. (2013). Neuropathological diagnostic considerations in hyperkinetic movement disorders. *Frontiers in Neurology*, 4 FEB.
- Farrer, M. J. (2006). Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 306–318.
- Freund, M., Walther, T., & Von Bohlen Und Halbach, O. (2012). Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell and Tissue Research*, 348(1), 29–35.
- Fuxe, K., Ganten, D., Hökfelt, T., Locatelli, V., Poulsen, K., Stock, G., ... Taugner, R. (1980). Renin-like immunocytochemical activity in the rat and mouse brain. *Neuroscience Letters*, 18(3), 245–250.
- Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Fernandez-Rodriguez, P., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Structure and Function*, pp. 1–13.
- Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2013). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: An intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Structure and Function*, 218(2), 373–388.
- Hirsch, E. C., Jenner, P., & Przedborski, S. (2013). Pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*.
- Iwai, M. and Horiuchi, M. (2009). Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT1 receptor axis vs. ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. *Hypertension Research*, 32(7), pp.533-536.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79(4), 368–76.
- Jankovic, J., & Aguilar, L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*.
- Jiang, T., Gao, L., Lu, J., & Zhang, Y.-D. (2013). ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Current Neuropharmacology*, 11(68), 209–217.

- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: Relevance to progression of the disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 656–669.
- Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE (2008) AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 120(3):292-316.
- Kaschina, E., & Unger, T. (2003). Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Pressure*, 12(2), 70–88.
- Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., & Lees, a. (2003). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (2), CD003735.
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 9–21.
- Krishna, A., Biryukov, M., Trefois, C., Antony, P. M. A., Hussong, R., Lin, J., ... May, P. (2014). Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*, 15(1), 1–21.
- Kumar, R., Singh, V. P., & Baker, K. M. (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Kumar, R., Thomas, C. M., Yong, Q. C., Chen, W., & Baker, K. M. (2012). The intracrine renin–angiotensin system. *Clinical Science*, 123(5), 273–284.
- Labandeira-Garcia, J. L., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., & Rodríguez-Perez, A. I. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., & Rodríguez-Perez, A. I. (2013). Dopamine-Angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Movement Disorders*.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., & Guerra, M. J. (2012). Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis*, 1, 226–244.
- Lev-Ran, A., & Porta, M. (2005). Salt and hypertension: A phylogenetic perspective. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*.
- Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Kruger, R.,

- Rocca, W. A. (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann. Neurol.*, 55(0364–5134), 512–521.
- Martínez-Fernández, R., Gasca-Salas C., C., Sánchez-Ferro, Á., & Ángel Obeso, J. (2016). ACTUALIZACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(3), 363–379.
- Nambu, A., Tokuno, H., & Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neuroscience Research*.
- Pankratz, N., & Foroud, T. (2007). Genetics of Parkinson disease. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 9(April), 801–11.
- Paul, M. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*, 86(3), 747–803.
- Peterson, D. S., & Horak, F. B. (2016). Neural Control of Walking in People with Parkinsonism. *Physiology*, 31(2), 95–107.
- Potashkin, J. A., Blume, S. R., & Runkle, N. K. (2012). Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. *SAGE-Hindawi Access to Research*.
- Re, R. N. (2003). Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*.
- Re, R. N. (2007). Intracellular renin-angiotensin system: the tip of the intracrine physiology iceberg. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(2), pp.H905-H906.
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Muñoz, A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of Disease*, 31(1), 58–73.
- Santos, R., e Silva, A., Maric, C., Silva, D., Machado, R., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S., Lopes, M., Bader, M., Mendes, E., Lemos, V., Campagnole-Santos, M., Schultheiss, H., Speth, R. and Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp.8258-8263.
- Savitt, J., Dawson, V., & Dawson, T. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1744–1754.
- Schlachetzki, J. C. M., Saliba, S. W., & de Oliveira, A. C. P. (2013). Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2).
- Seidman, K., Barsuk, J., Johnson, R. and Weyhenmeyer, J. (1996). Differentiation of NG108-15 Neuroblastoma Cells by Serum Starvation or Dimethyl Sulfoxide Results in Marked

- Differences in Angiotensin II Receptor Subtype Expression. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), pp.1011-1018.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Than, A., Leow, M. and Chen, P. (2013). Control of Adipogenesis by the Autocrine Interplays between Angiotensin 1–7/Mas Receptor and Angiotensin II/AT1Receptor Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), pp.15520-15531.
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Muñoz, A., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(11), 1130–1142.
- Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Iglesias-Gonzalez, J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death and Disease*, 7(10), e2427.
- Van Den Eeden, S. K. (2003). Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157(>11), 1015–1022.
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Mejide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1726–1738.
- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiology of Aging*, 33(1).
- Wright, J. W., Kawas, L. H., & Harding, J. W. (2013). A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 158.